

(19) 日本国特許庁 (J P)

(12) 公開特許公報 (A)

(11) 特許出願公開番号

特開平11-169703

(43) 公開日 平成11年(1999) 6月29日

(51) Int.Cl.⁹

識別記号

F I

B 0 1 J 13/00

B 0 1 J 13/00

E

A 6 1 L 15/44

A 6 1 L 25/00

A

25/00

C 1 2 N 11/02

11/08

C 1 2 N 11/02

11/08

A 6 1 L 15/03

審査請求 未請求 請求項の数7 O L (全 9 頁)

(21) 出願番号

特願平9-347922

(22) 出願日

平成9年(1997)12月17日

(71) 出願人 596009814

株式会社エムアンドエム研究所
山梨県塩山市熊野275

(72) 発明者 吉岡 浩

神奈川県秦野市下落合11番-1

(72) 発明者 森 有一

神奈川県横浜市金沢区釜利谷南3-21-2
-4

(72) 発明者 窪田 俊

東京都国立市東3-21-24

(74) 代理人 弁理士 長谷川 芳樹 (外6名)

(54) 【発明の名称】 熱可逆ハイドロゲル形成性組成物

(57) 【要約】

【課題】 ゲル中に保持された生理活性物質本来の活性を良好に維持可能な熱可逆ハイドロゲル形成性組成物を提供する。

【解決手段】 ハイドロゲル形成性高分子と、水と、生理活性物質とを少なくとも含む組成物。該ゾルーゲル転移温度(第1のゾルーゲル転移温度)が5℃以上40℃以下であり、該ゾルーゲル転移温度より高い温度で実質的に水不溶性のハイドロゲル状態となり、且つ、該ゾルーゲル転移温度より低い温度で可逆的に水可溶性を示す。

【特許請求の範囲】

【請求項 1】 ハイドロゲル形成性高分子と、水と、生理活性物質とを少なくとも含み；ゾルーゲル転移温度

（第 1 のゾルーゲル転移温度）が 5℃以上 40℃以下であり、該ゾルーゲル転移温度より高い温度で実質的に水不溶性のハイドロゲル状態となり、且つ、該ゾルーゲル転移温度より低い温度で可逆的に水可溶性を示す熱可逆

ハイドロゲル形成性組成物であって；且つ、前記水不溶性のハイドロゲル状態において、該ゲル中の前記生理活性物質の初期含有量（A）と、大過剰の水中に浸漬した後の該ゲル中の生理活性物質の含有量（B）との比（B/A）が 80%以上であることを特徴とする熱可逆ハイドロゲル形成性組成物。

【請求項 2】 前記生理活性物質の分子量が 1,000 以上である請求項 1 記載の熱可逆ハイドロゲル形成性組成物。

【請求項 3】 前記生理活性物質が、前記ハイドロゲル形成性高分子に結合されている請求項 1 記載の熱可逆ハイドロゲル形成性組成物。

【請求項 4】 前記生理活性物質が生体高分子である請求項 1 ないし 3 のいずれかに記載の熱可逆ハイドロゲル形成性組成物。

【請求項 5】 前記第 1 のゾルーゲル転移温度より低温の領域であって、且つ 0℃以上 37℃以下の領域に第 2 のゾルーゲル転移温度を有し、該第 2 のゾルーゲル転移温度より低い温度でゲル状態となり、且つ、

該第 2 のゾルーゲル転移温度より高く、且つ前記第 1 のゾルーゲル転移温度より低い温度でゾル状態となる請求項 1 記載の熱可逆ハイドロゲル形成性組成物。

【請求項 6】 ハイドロゲル形成性高分子と、水と、生理活性物質とを少なくとも含み；且つ、少なくとも第 1 のゾルーゲル転移温度、および該第 1 のゾルーゲル転移温度より低い第 2 のゾルーゲル転移温度を有することを特徴とする熱可逆ハイドロゲル形成性組成物。

【請求項 7】 前記第 1 のゾルーゲル転移温度より高い温度で実質的に水不溶性のハイドロゲル状態となり、該ゾルーゲル転移温度より低い温度で可逆的に水可溶性を示し；前記第 2 のゾルーゲル転移温度より低い温度でゲル状態となり；且つ、

該第 2 のゾルーゲル転移温度より高く、且つ前記第 1 のゾルーゲル転移温度より低い温度領域でゾル状態となる請求項 6 記載の熱可逆ハイドロゲル形成性組成物。

【発明の詳細な説明】

【0001】

【発明の属する技術分野】本発明は、温度変化に対応してハイドロゲル状態と水溶液状態（ゾル）とが可逆的に変化する熱可逆（性）ハイドロゲル形成性組成物であって、更に種々の生理活性を示すことが可能な生理活性物

質を含有する熱可逆ハイドロゲル形成性組成物に関する。

【0002】より詳しくは、本発明は、第 1 のゾルーゲル転移温度より低温側でゾル状態となり、該第 1 の転移温度の高温側でゲル状態となるような「昇温時ゲル化タイプ」の特性を有する熱可逆ハイドロゲル形成性組成物に関する。

【0003】本発明の熱可逆ハイドロゲル形成性組成物は、その昇温時ゲル化タイプの特性を活かして、細胞（組織）培養担体、創傷被覆材、生体接着剤等に、特に好適に利用可能である。

【0004】

【従来の技術】熱可逆性を示すハイドロゲルとしては、寒天やゼラチンのゲルがよく知られている。寒天やゼラチンの水溶液は、冷却により流動性を失ってゼリー状のハイドロゲルとなり、加熱によって再び水溶液に戻るタイプ、すなわち、降温時ゲル化タイプの熱可逆ゾルーゲル転移を示す。

【0005】これらのハイドロゲルとは逆に、加熱によってハイドロゲルとなる昇温時ゲル化タイプの性質を示すものとしては、多糖類誘導体であるメチルセルロースの水溶液が知られている。しかしながら、メチルセルロース水溶液は 45℃以上の高温でしかゲルとならないため、実用上の利用価値が殆どなく、従来より、その昇温時ゲル化タイプの特性は殆ど活用されていない。

【0006】一方、非イオン性界面活性剤の中にも、その水溶液が昇温時ゲル化タイプの熱可逆ゾルーゲル転移を示すものがある。例えば、ポリプロピレンオキシドの両端にポリエチレンオキシドが結合されてなるプルロニック F-127（商品名、BASF Wyandotte Chemicals Co. 製）の高濃度水溶液は、約 20℃以上でハイドロゲルとなり、それより低い温度で水溶液となることが知られている（例えば、B. Chu, Langmuir, 11, 414-421 (1995)を参照）。

【0007】しかしながら、この材料（プルロニック F-127）の場合、約 20wt% 以上の高濃度でしかハイドロゲルを形成せず、したがって生成したハイドロゲル中の含水率が低いという問題があった。

【0008】また、この材料を用いた場合、約 20wt% 以上の高濃度でゲル化させ、ゲル化温度より高い温度に保持した場合であっても、該ゲルに更に水を加えるとゲルが溶解してしまう（すなわち、ハイドロゲルが水溶性である）という問題があった。このような現象は、例えば、該ゲルを創傷被覆材として使用した場合には、創傷面から分泌される滲出液によって、該ハイドロゲルが創傷面中に溶解・消失してしまうという重大な欠点につながる。

【0009】

【発明が解決しようとする課題】本発明の目的は、上記した従来の熱可逆ハイドロゲル形成性組成物の欠点を解

10

20

30

40

50

消した熱可逆ハイドロゲル形成性組成物を提供することにある。

【0010】本発明の他の目的は、ゲル中に生理活性物質を良好に保持し得る熱可逆ハイドロゲル形成性組成物を提供することにある。

【0011】本発明の更に他の目的は、ゲル中に保持された生理活性物質本来の活性を良好に維持可能な熱可逆ハイドロゲル形成性組成物を提供することにある。

【0012】

【課題を解決するための手段】本発明者らは鋭意研究の結果、特定の熱可逆ハイドロゲル形成性高分子を含む組成物が、該ハイドロゲル中に生理活性物質自体を好適に保持可能であるのみならず、該ゲル中において該生理活性物質本来の機能を実質的に保持可能であることを見出した。

【0013】本発明の熱可逆ハイドロゲル形成性組成物は上記知見に基づくものであり、より詳しくは、ハイドロゲル形成性高分子と、水と、生理活性物質とを少なくとも含み；ゾルーゲル転移温度（第1のゾルーゲル転移温度）が5℃以上40℃以下であり、該ゾルーゲル転移温度より高い温度で実質的に水不溶性のハイドロゲル状態となり、且つ、該ゾルーゲル転移温度より低い温度で可逆的に水可溶性を示す熱可逆ハイドロゲル形成性組成物であって；且つ、前記水不溶性のハイドロゲル状態において、該ゲル中の前記生理活性物質の初期含有量

(A)と、大過剰の水中に浸漬した後の該ゲル中の生理活性物質の含有量(B)との比(B/A)が80%以上であることを特徴とするものである。

【0014】本発明によれば、更に、ハイドロゲル形成性高分子と、水と、生理活性物質とを少なくとも含み；且つ、少なくとも第1および第2のゾルーゲル転移温度を有することを特徴とする熱可逆ハイドロゲル形成性組成物が提供される。

【0015】上記構成を有する本発明の熱可逆ハイドロゲル形成性高分子を含む組成物は、該ハイドロゲル中に生理活性物質自体を好適に保持可能であるのみならず、該ゲル中において該生理活性物質本来の機能を実質的に保持可能であるため、ゲル内に生理活性物質を固定化することにより、種々の用途に広く利用することが可能となる。

【0016】本発明者らはすでに、ゾルーゲル転移温度が5℃以上40℃以下であり、該転移温度より低い温度でゾル、該転移温度より高い温度の温度でゲルとなり、該ゲルが実質的に水不溶性であることを特徴とする昇温時ゲル化タイプの熱可逆ハイドロゲル形成性組成物を開発してきた（特開平5-262882）。上記熱可逆ハイドロゲル形成性組成物中に低分子量の生理活性物質を含有させ、上記ハイドロゲルに様々な生理活性を付与させることも提案されている（特願平8-29572、W0 95/15152）。

【0017】しかしながら、これらの従来の昇温時ゲル化タイプ熱可逆ハイドロゲル形成性組成物と比較して、上述した本発明の熱可逆ハイドロゲル形成性組成物に基づいて形成されたハイドロゲルにおいては、比較的分子量の生理活性物質であっても該ハイドロゲル中の高分子網目をすり抜けたり、容易にハイドロゲルの外部へ拡散することがより効果的に抑制されているため、より長い期間に渡って、生理活性物質を含有するハイドロゲルが該生理活性を維持することが可能となる。

【0018】上記した先願の昇温時ゲル化タイプ熱可逆ハイドロゲル形成性組成物のゾルーゲル転移温度を室温付近に設定すれば、室温以下でゾル、細胞培養温度や体温（37℃）でハイドロゲルとなるので、室温液状で細胞を取り込み、37℃に昇温してゲル化させ、細胞をゲル内で3次元的に培養できる細胞（組織）培養担体（特開平6-141851）や、室温液状で創面上に塗布し、体温（37℃）でゲル化させ、創面を保護することのできる創傷被覆材（W0 95/07719）などが提供される。

【0019】しかしながら、該従来の昇温時ゲル化タイプ熱可逆ハイドロゲル形成性組成物と比較して、本発明の熱可逆ハイドロゲル形成性組成物は、生理活性物質をも含有するため、細胞接着性等の生体に対する親和性において、これら従来のハイドロゲルより優れる特性を有する。

【0020】加えて、従来の昇温時ゲル化タイプ熱可逆ハイドロゲル形成性組成物は、そのゾルーゲル転移温度より低温側の氷点より高い温度では常に液状であるために、その利用が制限される場合があった。例えば、培養細胞や組織等を保存する際に、その代謝活性を低く抑えるためには、できるだけ低温で保存することが有利である。ただし、氷点より低い温度では細胞等に対し凍結によるダメージを与えるので、氷点より高い温度の、しかもできる限り低温が望ましい。しかしながら、従来の昇温時ゲル化タイプ熱可逆ハイドロゲル形成性組成物は、そのゾルーゲル転移温度より低温側の氷点より高い温度では常に液状であるために、細胞等が沈降したり、輸送中に細胞同士あるいは細胞と容器壁が衝突することによる物理的傷害を細胞等が被るという現象が生ずる場合があった。

【0021】これに対して、本発明の第1および第2のゾルーゲル転移温度を有する熱可逆ハイドロゲル形成性組成物を用いた場合には、第2のゾルーゲル転移温度より低温でゲル状態とすることができ、上記した細胞等の沈降や、細胞の傷害を効果的に抑制することが可能となる。

【0022】

【発明の実施の形態】以下、本発明を詳細に説明する。以下の記述において、量比を表す「%」および「部」は、特に断らない限り重量基準（すなわち、重量%およ

び重量部)とする。

【0023】(ハイドロゲル形成性の高分子)本発明に使用可能な「ハイドロゲル形成性の高分子」は、その水溶液または水分散液が5℃以上、40℃以下の温度領域中のある特定の温度より高い温度でハイドロゲルとなり、且つ、該温度より低い温度ではゾルないし液状となる特性を有する。本明細書においては、該「特定の温度」を、(第1の)「ゾル-ゲル転移温度」と称する。

【0024】本発明の熱可逆ハイドロゲル形成性組成物が上記(第1の)ゾル-ゲル転移温度より低い温度で一旦ゾル状態となり、更に冷却すると再びゲル状態となる場合、本明細書においては、この際の転移温度を、「第2のゾル-ゲル転移温度」と称する。

【0025】(ゾル-ゲル転移温度)本発明において、試料のゾル-ゲル転移温度の測定は、文献(H. Yoshiokaら、Journal of Macromolecular Science, A31(1), 113(1994))に記載された方法に従う。

【0026】即ち、観測周波数1Hzにおける試料の動的弾性率を徐々に温度を変化(低温側から高温側へ、または高温側から低温側へ1℃/1分)させて測定し、該試料の貯蔵弾性率(G' 、弾性項)と損失弾性率

(G'' 、粘性項)が交差する点の温度をゾル-ゲル転移温度とする。一般に、 $G'' > G'$ の状態がゾル、 $G'' < G'$ の状態がゲルと定義される。昇温時と降温時でゾル-ゲル転移温度が(例えば、絶対値で2℃以上)異なる場合には、その中間の温度をゾル-ゲル転移温度とする。このゾル-ゲル転移温度の測定に際しては、下記の測定条件が好適に使用可能である。

【0027】<動的弾性率の測定条件>

測定機器：商品名=ストレス制御式レオメーターCSL500、Carri-Med社製

試料溶液(ないし分散液)の濃度(ただし「ハイドロゲル形成性高分子」の濃度として)：10(重量)%

試料溶液の量：約0.8g

測定用セルの形状・寸法：アクリル製平行円盤(直径4.0cm)、ギャップ600μm。

【0028】適用ストレス：線形領域内。

【0029】(実質的に水不溶)本発明の熱可逆ハイドロゲル形成性組成物は、そのゾル-ゲル転移温度より高い温度で実質的に水不溶性のハイドロゲル状態となるが、該ゲル化の後に、多量の水中に浸漬しても、該ゲルは実質的に溶解しない。上記ハイドロゲルの上記特性は、例えば、以下のようにして確認することが可能である。

【0030】すなわち、本発明のハイドロゲル形成性組成物0.15gを、上記ゾル-ゲル転移温度より低い温度(例えば水冷下)で、蒸留水1.35gに溶解して10W%の水溶液を作製し、該水溶液を径が3.5mmのプラスチックシャーレ中に注入し、ゾル-ゲル転移温度より高い温度 T_h (例えば37℃)に加温することによ

て、厚さ約1.5mmのゲルを該シャーレ中に形成させた後、該ゲルを含むシャーレ全体の重量(f グラム)を測定する。次いで、該ゲルを含むシャーレ全体を250ml中の水中に上記温度 T_h で10時間静置した後、該ゲルを含むシャーレ全体の重量(g グラム)を測定して、ゲル表面からの該ゲルの溶解の有無を評価する。この際、本発明のハイドロゲル形成性組成物においては、上記ゲルの重量減少率、すなわち $(f-g)/f$ が、5.0%以下であることが好ましく、更には1.0%以下(特に0.1%以下)であることが好ましい。

【0031】本発明の熱可逆ハイドロゲル形成性組成物の水溶液は、上記ゾル-ゲル転移温度より高い温度(T_h)でゲル化させた後、該温度 T_h で多量(体積比で、ゲルの0.1~100倍程度)の水中に浸漬しても、長期間(例えば、3ヶ月間程度)に亘って該ゲルは溶解することがない。

【0032】上記したゾル-ゲル転移温度より高い温度(T_h)は、「ゾル-ゲル転移温度」より5℃以上高い温度であることが好ましく、更には、10℃以上高い温度であることが好ましい。

【0033】(共重合体)本発明に使用可能なハイドロゲル形成性の高分子は、上記の特性を有するものであれば特に制限はないが、特に、その水溶液が曇点を有する高分子と親水性高分子を結合してなる共重合体であって、且つ、分子量10万以上のものが好ましく用いられる。

【0034】ここに分子量10万以上の共重合体とは、該曇点より低い(例えば、絶対値で2℃以上低い)温度において、その水溶液を分画分子量10万の限外濾過膜(アミコン社製YM100)を用いて限外濾過した時、実質的に濾過されないものをいう。より具体的には、下記の条件下で分画分子量10万の限外濾過膜を用いて、蒸留水中で限外濾過した場合に、濾液に検出される高分子が高分子全体の10%以下(更には5%以下)であることを言う。

【0035】<限外濾過方法>ハイドロゲル形成性の高分子をその(第1の)ゾル-ゲル転移温度より低い温度で蒸留水に濃度0.5wt%で溶解し、分画分子量10万の限外濾過膜(アミコン社製YM100)を用いて1kg/cm²の加圧下で濾過原液の量が1/2になるまで限外濾過し、濾液を採取する。実質的に濾過されないとは、該濾液中の高分子濃度を定量した時、その濃度が0.05wt%以下(更には0.025wt%以下)であることを言う。

【0036】(曇点)曇点とは、透明な高分子の水溶液(濃度1wt%)を徐々に(例えば、1℃/分程度で)加熱した時、はじめて白濁を生じる温度を言う。本発明においては、ハイドロゲル形成性の高分子の(第1の)ゾル-ゲル転移温度を5℃~40℃とするためには、この曇点が5℃~40℃であることが望ましい。すなわ

ち、その水溶液が曇点を有する高分子は曇点より低い温度では水に溶解するが、曇点より高い温度では非水溶性となり水から析出する。

【0037】（曇点を有する高分子）その水溶液が曇点を有する高分子としては、ポリ-N-イソプロピルアクリルアミド、ポリ-N-n-プロピルアクリルアミド、ポリ-N-シクロプロピルアクリルアミド、ポリ-N, N-ジエチルアクリルアミド、ポリ-N-アクリロイルピペリジン、ポリ-N-アクリロイルピロリジン、ポリ-N, N-エチルメチルアクリルアミドなどのポリN置換アクリルアミド誘導体、ポリ-N-イソプロピルメタアクリルアミド、ポリ-N-シクロプロピルメタアクリルアミドなどのポリN置換メタアクリルアミド誘導体、ポリプロピレンオキサイドなどのポリアルキレンオキサイド、ポリビニルメチルエーテル、ポリビニルアルコール部分酢化物などが挙げられる。

【0038】上記の高分子化合物は単独でも、他の単量体と共重合させて得たものでも良い。共重合する単量体としては、親水性単量体、疎水性単量体のいずれも用いることができる。一般的にポリN置換（メタ）アクリルアミド誘導体の曇点は親水性単量体と共重合すると上昇し、疎水性単量体と共重合すると下降する。従って、これらを選択することによっても、所望の曇点を有する高分子を得ることができる。

【0039】（親水性単量体）親水性単量体としては、N-ビニルピロリドン、ビニルピリジン、アクリルアミド、メタアクリルアミド、N-メチルアクリルアミド、ヒドロキシエチルメタアクリレート、ヒドロキシエチルアクリレート、ヒドロキシメチルメタアクリレート、ヒドロキシメチルアクリレート、酸性基を有するアクリル酸、メタアクリル酸およびそれらの塩、ビニルスルホン酸、スチレンスルホン酸など、並びに塩基性基を有するN, N-ジメチルアミノエチルメタクリレート、N, N-ジエチルアミノエチルメタクリレート、N, N-ジメチルアミノプロピルアクリルアミドおよびそれらの塩などが挙げられるが、これらに限定されるものではない。

【0040】（疎水性単量体）一方、疎水性単量体としては、エチルアクリレート、メチルメタクリレート、n-ブチルメタクリレート、グリシジルメタクリレート等のアクリレート誘導体およびメタクリレート誘導体、N-n-ブチルメタアクリルアミドなどのN置換アルキルメタアクリルアミド誘導体、塩化ビニル、アクリロニトリル、スチレン、酢酸ビニルなどが挙げられるが、これらに限定されるものではない。

【0041】（親水性高分子）本発明における親水性高分子としては、例えば、メチルセルロース、デキストラン、ポリエチレンオキサイド、ポリビニルアルコール、ポリ-N-ビニルピロリドン、ポリビニルピリジン、ポリアクリルアミド、ポリメタアクリルアミド、ポリ-N-メチルアクリルアミド、ポリヒドロキシメチルアクリレー

ト、ポリアクリル酸、ポリメタクリル酸、ポリビニルスルホン酸、ポリスチレンスルホン酸およびそれらの塩、ポリN, N-ジメチルアミノエチルメタクリレート、ポリN, N-ジエチルアミノエチルメタクリレート、ポリN, N-ジメチルアミノプロピルアクリルアミドおよびそれらの塩などが挙げられる。さらに種々の水溶性の生体高分子も本発明における親水性高分子として使用可能である。例えば、ゼラチン、アルブミン、グロブリン、フィブリノーゲン、インスリン、グルカゴンなどのタンパク質やペプチド類、デンプン、アガロース、グリコーゲン、ヒアルロン酸、ヘパリンなどの多糖類、RNA、DNAなどの核酸類が挙げられる。

【0042】（熱可逆ゾルーゲル転移のメカニズム）本発明のハイドロゲル形成性の高分子は転移温度の低温側では流動性のある水溶液、高温側では流動性を失ってハイドロゲルとなる昇温時ゲル化タイプの熱可逆ゾルーゲル転移を示す。本発明者の知見によれば、そのメカニズムは以下のように推定される。

【0043】すなわち、共重合体中の曇点を有する高分子部分の曇点より低い温度では、該曇点を有する高分子部分、親水性高分子部分ともに水溶性であるので、該共重合体は完全に水に溶解する。しかし、この水溶液の温度を該曇点より高い温度に昇温すると、該曇点を有する高分子部分が非水溶性となって凝集し分子間会合が起こる。一方、親水性高分子部分は該曇点より高い温度においても水溶性を保つので、該曇点を有する高分子部分間の凝集が巨視的な相分離に至ることを防止し、安定なハイドロゲルが形成される。

【0044】（曇点を有する高分子の含有量）本発明に用いられるハイドロゲル形成性の高分子における、その水溶液が曇点を有する高分子（A）と親水性高分子（B）を結合してなる共重合体中の（A）の含有量は、10～90重量%（更には、30～70重量%）の範囲であることが好ましい。曇点を有する高分子（A）の含有量が10重量%未満の場合、該曇点を有する高分子部分間の凝集力が不十分なために、該曇点より高い温度でもハイドロゲルとなり難い傾向が強まる。他方、高分子（A）の含有量が90重量%を上回る場合は、曇点を有する高分子部分間の凝集力が強すぎて、系全体が巨視的な相分離（著しいゲルのシネレシス）を起こし、安定なハイドロゲルが得られ難くなる傾向が強まる。

【0045】本発明者らは、上記親水性高分子部分（B）に、例えば水素結合等により、その水溶液が曇点を有する高分子（A）の曇点より低い温度で、親水性高分子間に凝集力が生起するような高分子化合物（例えばゼラチン、アガロースなど）を用いた場合、前記第1のゾルーゲル転移温度の他に、該第1のゾルーゲル転移温度より低温の領域に第2のゾルーゲル転移温度を有し、該第2のゾルーゲル転移温度より低い以下温度でゲル状態となり、該第2のゾルーゲル転移温度より高い温度で

且つ前記第1のゾルーゲル転移温度より低い温度でゾル状態となる熱可逆ハイドロゲル形成性組成物が得られることを見出した。細胞等の代謝を抑えてゲル中で保存するなどの点からは、このような第2のゾルーゲル転移温度は、通常0℃以上37℃以下（更には0℃以上30℃以下）であることが好ましい。

【0046】（2つのゾルーゲル転移温度）2つのゾルーゲル転移温度を有する系（ゲル形成性組成物）は、従来より知られていない。このように、ある系が「2つのゾルーゲル転移温度を有する」メカニズムは、本発明者の知見によれば、以下の様に推定される。

【0047】すなわち、第1のゾルーゲル転移温度より高い温度では、前述の通り、曇点を有する高分子部分が非水溶性となって凝集して、分子間会合が起こる。親水性高分子部分は該曇点より高い温度においても水溶性を保つので、該曇点を有する高分子部分間の凝集が巨視的な相分離に至ることを防止し、安定なハイドロゲルが形成される。

【0048】一方、第2のゾルーゲル転移温度より低い温度では、親水性高分子間に分子間会合が起こり、曇点を有する高分子部分が低温では水溶性となるので、両者が役割を逆転して安定なハイドロゲルが形成される。

【0049】第1のゾルーゲル転移温度より低温で、且つ、第2のゾルーゲル転移温度より高温の温度領域では、曇点を有する高分子部分間にも、親水性高分子部分間にも相互作用力が生じないので、ハイドロゲル形成性高分子は流動性のある水溶液状態となると推定される。

【0050】低温で分子間に凝集力が生じる系として、例えばゼラチンのようにヘリックス-コイル転移に基づく凝集力を利用する場合、ゾルーゲル転移挙動がヒステリシスを示し、昇温時と降温時でゾルーゲル転移温度が一致しないことがある。これは、ヘリックス-コイル転移が速度論的に長時間を要する過程であることに起因する。この場合、便宜的に昇温時ゾルーゲル転移温度と降温時ゾルーゲル転移温度の中間温度を、この系のゾルーゲル転移温度とみなすことができる。

【0051】（共重合体の結合様式）本発明に使用可能なハイドロゲル形成性の高分子における、その水溶液が曇点を有する高分子（A）と親水性高分子（B）を結合してなる共重合体の結合様式は、特に制限されない。該結合様式としては、例えば、AとBのブロック共重合体、あるいは主鎖Aに側鎖Bが結合したグラフト共重合体、または主鎖Bに側鎖Aが結合したグラフト共重合体などの様式が挙げられる。

【0052】（共重合体の製造方法）曇点を有する高分子と親水性高分子とのブロック共重合体は、例えば予め両者に反応活性な官能基（水酸基、カルボキシル基、アミノ基、イソシアネート基など）を複数導入し、両者を化学反応により結合させることによって得られる。

【0053】一般に、グラフト共重合体の合成法として

は、1）重合体の連鎖移動反応を利用する方法、2）幹重合体に遊離基に分裂し得る官能基を導入し、そこから重合を開始する方法、3）幹重合体からイオン重合を開始せしめる方法などが知られている。本発明のグラフト共重合体をこれらの方法によって得ることもできるが、側鎖の重合度を制御するという観点からは、曇点を有する高分子鎖中に1個の重合性官能基を導入し、親水性高分子を与える単量体と共重合させるか；あるいは親水性高分子鎖中に1個の重合性官能基を導入し、曇点を有する高分子を与える単量体と共重合させて得ることが有利である。

【0054】（生理活性物質）生理活性物質とは、生物の営む精妙な生命現象に、微量で関与し影響を与える有機物質、無機イオンを総称する。本発明においては、分子量が1,000以上、更には3,000以上（特に5,000以上）の生理活性物質が好適に使用可能である。該生理活性物質は、単一分子、または重合体のいずれであってもよい。必要に応じて、2種以上の生理活性物質を用いてもよいが、このような態様においては、該2種以上の生理活性物質のうち、少なくとも1種の分子量が1,000以上であることが好ましい。

【0055】本発明に使用可能な生理活性物質の一態様たる生体高分子の具体例としては、例えば、コラーゲン、ゼラチン、アルブミン、グロブリン、フィブリノーゲン、インスリン、グルカゴンなどのタンパク質やペプチド類、デンプン、グリコーゲン、ヒアルロン酸、セルロース、ヘパリンなどの多糖類、RNA、DNAなどの核酸が挙げられる。

【0056】（生理活性物質の含有方法）上記の生理活性物質を、熱可逆ハイドロゲル形成性組成物に含有させる方法は、特に制限されない。

【0057】このような含有手法の最も簡便なものとしては、生理活性物質の水溶液または水分散液を、ハイドロゲル形成性高分子の水溶液とそのゾルーゲル転移温度より低い温度で混合する方法が挙げられる。該混合の後、混合系の温度をゾルーゲル転移温度より高い温度に昇温することにより、ハイドロゲル形成性高分子が疎水相互作用によって形成される3次元網目構造中に生理活性物質が取り込まれ保持される。ここで、生理活性物質の分子量が1,000未満の場合、一旦網目構造中に保持された生理活性物質が上記3次元網目構造を容易にすり抜けて拡散してしまう傾向が強まり、ハイドロゲルが生理活性を長期間維持し難くなる。

【0058】他方、上記した生理活性物質が分子量の大きい高分子である場合には、該生理活性物質の水溶液相と、ハイドロゲル形成性高分子の水溶液相が相分離を起こし易くなり、両者を均一に混合することの困難性が高くなりやすい。

【0059】本発明者らは、鋭意研究の結果、生理活性物質をハイドロゲル形成性高分子に結合させることが、

該生理活性物質を熱可逆ハイドロゲル形成性組成物に含有させる点から、極めて効果的な方法であることを見出した。

【0060】このように生理活性物質をハイドロゲル形成性高分子に結合させる方法によれば、低分子量の生理活性物質であってもハイドロゲルからの拡散、溶出といった問題を防止できる。しかあしながらかの場合、低分子量の生理活性物質はハイドロゲル形成性高分子に結合させることによって、その生理活性が損なわれることも起こり得る。このような点からも、本発明で用いる生理活性物質の分子量は1,000以上であることが好ましい。この理由は、生理活性物質が高分子である場合、その一部の官能基がハイドロゲル形成性高分子との結合に使用されても、生理活性を発現する部位がその活性を維持したまま残存する可能性が高くなるためと推定される。

【0061】生理活性物質とハイドロゲル形成性高分子の結合方法としては、共有結合による結合が最も強固であるので望ましい。他方、生理活性物質が高分子電解質である場合には、ハイドロゲル形成性高分子に反対符号の電荷を導入し、静電的な相互作用を介する高分子間コンプレックスとして結合させても良い。例えば、生理活性物質がヘパリンのようなポリアニオンである場合、ハイドロゲル形成性高分子中の疊点を有する高分子ブロックまたは親水性高分子ブロックをポリカチオンとしておくことで、ポリイオンコンプレックスを形成させることができる。

【0062】生理活性物質をハイドロゲル形成性高分子に共有結合させる方法としては、例えば、生理活性物質中の官能基と結合反応しうる反応活性な官能基を、ハイドロゲル形成性高分子中の疊点を有する高分子ブロックまたは親水性高分子ブロック中に導入し、両者を結合反応させる方法がある。また、生理活性物質中に重合性官能基（例えばアクリロイル基）を導入しておき、ハイドロゲル形成性高分子を与える単量体と共重合させても良い。更には、生理活性物質とハイドロゲル形成性高分子の混合物（望ましくは混合水溶液）に放射線を照射して、両分子間に架橋構造を導入することもできる。

【0063】（生理活性物質の含有量）生理活性物質の含有量（ないし導入率）は、ハイドロゲルが生理活性機能を発現でき、熱可逆的なゾル-ゲル転移挙動が損なわれない範囲であれば特に制限はない。通常、生理活性を十分発揮できハイドロゲルの物性に重大な影響を及ぼさない範囲として、含有される生理活性物質の重量をC、ハイドロゲル形成性高分子の重量をDとした場合、生理活性物質の重量Aは、該生理活性物質を含めたハイドロゲル形成性高分子全体（C+D）との比 $C/(C+D)$ で0.1~70wt%、更には0.5~10wt%（特に1~5wt%）の範囲であることが好ましい。

【0064】（生理活性物質の保持性）本発明の熱可逆

ハイドロゲル形成性組成物は、前述したように第1のゾル-ゲル転移温度より高い温度で実質的に水不溶性のハイドロゲル状態となるが、この水不溶性のハイドロゲル状態において、該ゲルの前記生理活性物質の初期含有量を（A）とし、該ゲルを大過剰の水中に浸漬した後の該生理活性物質の含有量を（B）とした際に、これら含有量の比（B/A）が80%以上であることが好ましい。生理活性をより長期間維持するという点からは、この含有量の比（B/A）は、90%以上、更には95%以下であることが好ましい。

【0065】上記初期含有量（A）および浸漬後の含有量（B）は、以下の方法で好適に測定可能である。

【0066】＜生理活性物質含有量の測定方法＞初期含有量（A）の生理活性物質を含有する熱可逆ハイドロゲル形成性組成物1.5gを第1のゾル-ゲル転移温度より低い温度でゾル状態とし、直径35mmのプラスチック製シャーレ中に注入し、該ゾル-ゲル転移温度より高い温度でゲル化させ、該ゾル-ゲル転移温度より5℃高い温度の蒸留水250mlに該ゲルを含むシャーレを浸漬する。そのまま該ゾル-ゲル転移温度より5℃高い温度で1時間静置した後、水中から上記ゲルを含むシャーレを取り出し、余剰の水分を除去した後、該ゲル中の該生理活性物質の含有量（B）を測定する。生理活性物質含有量は、該生理活性物質の生理活性を生物学的あるいは生化学的手法（例えば、細胞増殖機能、細胞分化機能、酵素活性など）により定量しても良いし、物理化学的あるいは分光学的な手法（例えば、元素分析、IR、NMR、紫外可視吸光分析、液体クロマトグラフィーなど）を用いて適宜、定量することができる。このような生物学的、生化学的、物理化学的ないしは分光学的な手法の詳細に関しては、文献（例えば、実験生物学講座、1~17巻、1982年~1985年、丸善（株））を参照することができる。

【0067】以下に実施例を示し、本発明を具体的に説明するが、本発明は以下の実施例によって限定されるものではない。

【0068】

【実施例】実施例1

ゼラチン（ウシ骨製、和光純薬（株））1gを蒸留水9gに37℃で溶解し、N-アクリロイルスクシンイミド（国産化学（株））17mgを加えて37℃で4日間反応させることにより、ゼラチンに重合性基を導入してなる重合性ゼラチンの水溶液を得た。

【0069】N-イソプロピルアクリルアミド2.0gを蒸留水390gに溶解して得られた水溶液に、上記で得た重合性ゼラチン水溶液を加え、窒素気流下70℃に加熱して、10wt%過硫酸アンモニウム（APS）水溶液1mL及びN,N,N',N'-テトラメチルエチレンジアミン（TEMED）0.1mLを加えた。窒素気流下27℃に保持したまま、4時間重合させた。

【0070】上記反応後の反応液に、室温で蒸留水1.5 Lを加え、該水溶液を室温（27℃）で限外濾過膜（HP-01、アミコン社製）を用いて300 mLまで濃縮した。該濃縮液に蒸留水1.5 Lを加えて希釈し、再度300 mLまで限外濾過濃縮を行った。この希釈、濃縮操作を更に4回（合計5回）繰り返し、未反応物及び低分子量物を除去した。

【0071】上記により最終濃縮液を凍結乾燥することにより、ゼラチンを結合したハイドロゲル形成性高分子1.74 gを得た。元素分析（C、H、およびN）によりハイドロゲル形成性高分子中のゼラチン含有量を求めたところ、43 wt %であった。

【0072】得られたゼラチン結合ハイドロゲル形成性高分子0.50 gに蒸留水を加えて全体を10 gとし、室温（27℃）下で溶解して濃度5 wt %の均一水溶液とした。この水溶液の動的粘弾性挙動をストレス制御式レオメーター（Carri-Med社製、CSL-500）により観測したところ、1℃/分の速度で加温すると35℃で貯蔵弾性率G'が損失弾性率G''を上回ってハイドロゲルとなった（第1のゾルーゲル転移温度=35℃）。更に、該ハイドロゲルを45℃まで加温した後に、1℃/分の速度で冷却すると、35℃でゾルとなった（ゾルーゲル転移温度=35℃）。更に該ゾルを1℃/分の速度で冷却すると、14℃でゲル化した（降温時ゾルーゲル転移温度=14℃）。更に5℃まで冷却した後、1℃/分の速度で加温すると、28℃でゾルとなった（昇温時ゾルーゲル転移温度=28℃）。従って第2のゾルーゲル転移温度は21℃であった（14℃と28℃の中間温度として）。

【0073】実施例2

ゼラチン（ウシ骨製、和光純薬（株））1 gを蒸留水9 gに37℃で溶解し、N-アクリロイルスクシンイミド（国産化学（株））17 mgを加えて37℃で4日間反応させ、ゼラチンに重合性基を導入して、重合性ゼラチンの水溶液を得た。

【0074】N-イソプロピルアクリルアミド14.8 g及びn-ブチルメタクリレート0.76 gをエタノール135.7 gに溶解し、ポリエチレングリコールジメタクリレート（PDE-6000、日本油脂（株））6.2 gを蒸留水89.2 gに溶解した水溶液、及び上記の重合性ゼラチンの水溶液10 gを加え、窒素気流下70℃に加熱して10 wt %過硫酸アンモニウム（APS）水溶液1 mL及びN, N, N', N'-テトラメチルエチレンジアミン（TEMED）0.1 mLを加えた。窒素気流下70℃に保持したまま、上記APS水溶液及びTEMEDの添加を30分おきに5回繰り返し、重合させた。反応液を室温まで冷却し、4℃の蒸留水3 Lに攪拌下で混合し、反応物を溶解させた。該水溶液を4℃で限外濾過膜（HP-01、アミコン社製）を用いて300 mLまで濃縮した。濃縮液に蒸留水3 Lを加えて希釈、

再度4℃で300 mLまで限外濾過濃縮を行った。この希釈、濃縮操作を更に4回（合計5回）繰り返し、未反応物及び低分子量物を除去した。

【0075】得られた最終濃縮液を凍結乾燥して、ゼラチンを結合した熱可逆ハイドロゲル形成性組成物形成性高分子13.8 gを得た。得られたゼラチン結合熱可逆ハイドロゲル形成性組成物形成性高分子0.75 gに蒸留水を加えて全体を10 gとし、冷却下（4℃）で溶解して濃度7.5 wt %の均一水溶液とした。この水溶液を加温すると室温でハイドロゲルとなり、動的粘弾性の測定によりゾルーゲル転移温度を求めると、昇温時および降温時ともに15℃であった。該水溶液は0℃以上15℃より低い温度では常に液状であって、ゲル化することとはなかった。

【0076】比較例

N-イソプロピルアクリルアミド14.8 g及びn-ブチルメタクリレート0.76 gをエタノール135.7 gに溶解して得られた溶液に、ポリエチレングリコールジメタクリレート（PDE-6000、日本油脂（株））6.2 gを蒸留水89.2 gに溶解した水溶液を加え、窒素気流下70℃に加熱して、10 wt %過硫酸アンモニウム（APS）水溶液1 mL及びN, N, N', N'-テトラメチルエチレンジアミン（TEMED）0.1 mLを加えた。

【0077】窒素気流下70℃に保持したまま、上記APS水溶液及びTEMEDの添加を30分おきに5回繰り返し、重合させた。反応液を室温まで冷却し、4℃の蒸留水3 Lに攪拌下で混合し、反応物を溶解させた。該水溶液を4℃で限外濾過膜（HP-01、アミコン社製）を用いて300 mLまで濃縮した。濃縮液に蒸留水3 Lを加えて希釈、再度4℃で300 mLまで限外濾過濃縮を行った。この希釈、濃縮操作を更に4回（合計5回）繰り返し、未反応物及び低分子量物を除去した。最終濃縮液を凍結乾燥して、熱可逆ハイドロゲル形成性組成物形成性高分子13.8 gを得た。

【0078】得られた熱可逆ハイドロゲル形成性組成物形成性高分子0.75 gに蒸留水を加えて全体を10 gとし、冷却下（4℃）で溶解して濃度7.5 wt %の均一水溶液とした。この水溶液を加温すると室温でハイドロゲルとなり、動的粘弾性の測定によりゾルーゲル転移温度を求めると、昇温時および降温時ともに15℃であった。該水溶液は0℃以上15℃より低い温度では常に液状で、ゲル化することとはなかった。

【0079】実施例3

実施例2および比較例で得られたハイドロゲル形成性高分子をエチレンオキシドガス滅菌（エチレンオキシドガス濃度：20%、温度：55℃、4時間）した後、それぞれのハイドロゲル形成性高分子を、冷却下（4℃）で10%ウシ胎仔血清含有RPMI 1640培地（ギブコ社製）に溶解して、濃度7.5 wt %の均一水溶液と

した。

【0080】上記のより得られた培地（２種類）のそれぞれに、正常ヒト肺由来繊維芽細胞（商品名：NHL F、宝酒造（株）社製）を冷却下（４℃）で分散させ（細胞濃度 2×10^4 個／mL）、３７℃に昇温してゲル化させた。５％炭酸ガス培養器中で３７℃、３日間培養したところ、実施例２のハイドロゲル形成性高分子を用いた場合には繊維芽細胞の増殖が認められたのに対し、比較例のハイドロゲル形成性高分子を用いた場合には、繊維芽細胞の増殖が認められなかった。該増殖の有無は、光学顕微鏡観察およびSDI法（コハク酸脱水素酵素活性測定法）により判定した。ここで用いた光学顕微鏡観察およびSDI法の詳細については、文献（例えば、実験生物学講座、１～１７巻、１９８２年～１９８５年、丸善（株））を参照することができる。

【0081】実施例４

実施例２および比較例で得られたハイドロゲル形成性高分子をエチレンオキシドガス滅菌し、冷却下（４℃）で、それぞれ１０％ウシ胎仔血清含有RPMI1640培地（ギブコ社製）に溶解して濃度１０wt％の均一水溶液とした。

【0082】この培地０．１mLにC3H／Heマウスのランゲルハンス島（ラ氏島）細胞１００個を冷却下（４℃）で分散させ、３７℃に昇温してゲル化させた。ラ氏島含有ハイドロゲルに１０％ウシ胎仔血清含有RPMI1640培地３mLを加え、５％炭酸ガス培養器中３７℃で３０日間培養し、２日ごとに替えた培養液中のインスリン濃度を測定した。実施例２のハイドロゲル形成性高分子を用いた場合はインスリン濃度が培養初期に５．８mU／mL、３０日後に５．６mU／mLと高値を維持した（すなわち、ラ氏島細胞は、その活性を維持した）。他方、比較例のハイドロゲル形成性高分子を用いた場合には、インスリン濃度が培養初期に３．５mU／mL、３０日後に１．０mU／mLと低値で推移した。

【0083】上記により、細胞接着因子を有するゼラチンを熱可逆ハイドロゲル形成性組成物に含有させること

で、細胞組織（ラ氏島）のインスリン分泌能を長期間に渡ってハイドロゲル中で発現、維持させることが明らかとなった。

【0084】

【発明の効果】上述したように本発明によれば、ハイドロゲル形成性高分子と、水と、生理活性物質とを少なくとも含み；ゾルーゲル転移温度（第１のゾルーゲル転移温度）が５℃以上４０℃以下であり、該ゾルーゲル転移温度より高い温度で実質的に水不溶性のハイドロゲル状態となり、且つ、該ゾルーゲル転移温度より低い温度で可逆的に水可溶性を示す熱可逆ハイドロゲル形成性組成物であって；且つ、前記水不溶性のハイドロゲル状態において、該ゲル中の前記生理活性物質の初期含有量

（Ａ）と、大過剰の水中に浸漬した後の該ゲル中の生理活性物質の含有量（Ｂ）との比（Ｂ／Ａ）が８０％以上であることを特徴とする熱可逆ハイドロゲル形成性組成物が提供される。

【0085】本発明によれば、更に、ハイドロゲル形成性高分子と、水と、生理活性物質とを少なくとも含み；且つ、少なくとも第１および第２のゾルーゲル転移温度を有することを特徴とする熱可逆ハイドロゲル形成性組成物が提供される。

【0086】本発明の熱可逆ハイドロゲル形成性組成物を用いれば、従来の昇温時ゲル化タイプ熱可逆ハイドロゲル形成性組成物に様々な生理活性機能（例えば、生体適合性、細胞接着性、細胞増殖能促進、細胞分化能促進などの機能）を付加することが可能となる。したがって、これらの生理活性機能を利用する用途、例えば、細胞（組織）培養器材、創傷被覆材、生体接着剤、DDS用基材、塞栓剤、関節易滑剤などとして、特に制限なく利用することが可能である。

【0087】また本発明の熱可逆ハイドロゲル形成性組成物には、従来の昇温時ゲル化タイプ熱可逆ハイドロゲル形成性組成物に、降温時ゲル化タイプの特性を付与することも可能であるため、上記のような生化学ないし医学領域に革新的な製品をもたらすことも可能となる。

THIS PAGE BLANK (USPTO)